

(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau

WIPO

(43) International publication date

22 February 2001 (22.02.2001)

PCT

(10) International publication number

WO 01/13123 A2

(51) International patent classification⁷: G01N 33/86,
33/58, 33/543

(21) International application number: PCT/DE00/02748

(22) International filing date: 11 August 2000 (11.08.2000)

(25) Language of filing: German

(26) Language of publication: German

(30) Data relating to the priority:
199 37 654.9 14 August 1999 (14.08.1999) DE
199 41 447.5 31 August 1999 (31.08.1999) DE(71) Applicant (for all designated States except US):
NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT
GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN
[DE/DE]; Ulrich-Schalk-Str. 3a, D-91056 Erlangen
(DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (US only): BERTLING, Wolf
[DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE).(74) Attorney: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse
(75) 49 A, D-91052 Erlangen (DE).(81) Designated states (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO,
RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated states (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-
Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).**Published**

- Without the International Search Report and to be republished once the report has been received.

For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette

As printed

(54) Title: METHOD FOR INDIRECTLY DETERMINING THE BLOOD-CLOTTING STATUS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR INDIREKTEN BESTIMMUNG DES BLUTGERINNUNGSSTATUS

(57) Abstract: The invention relates to a method for indirectly determining the blood-clotting status. The inventive method comprises the following steps: a) collecting body fluids which contain a protein that can be modified by a vitamin K-dependent γ -carboxylase, b) determining at least two concentrations selected from a group consisting of a first concentration C1 of carboxylated protein, a second concentration C2 of decarboxylated protein and an entire concentration C3 of carboxylated and decarboxylated protein, whereby the first concentration C1 is determined using a first antibody A1, the second concentration using a second antibody A2 and the third concentration C3 using a third antibody A3, c) generating a first quotient Q1 from the first C1 and second concentration C2 or generating a second quotient Q2 from the third C3 and first concentration C1 or generating a third quotient Q3 from the third C3 and second concentration C2, whereby a concentration C1, C2, C3 which has not been determined in step b) and which is required for generating the first Q1, the second Q2 or the third quotient Q3 is calculated according to the following relation: C3 C2 = C1 and d) the first, second or third quotient Q1, Q2, Q3 are correlated with the blood-clotting status.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten: a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält; b) Ermittlung von mindestens zwei Konzentrationen ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus einer ersten Konzentration (C1) an carboxylierten Protein, einer zweiten Konzentration (C2) an decarboxyliertem Protein und einer Gesamtkonzentration (C3) an carboxyliertem und decarboxyliertem Protein, wobei die erste Konzentration (C1) unter Verwendung eines ersten Antikörpers (A1), die zweite Konzentration unter Verwendung eines zweiten Antikörpers (A2) und die dritte Konzentration (C3) unter Verwendung eines dritten Antikörpers (A3) ermittelt wird; c) Bildung eines ersten Quotienten (Q1) aus erster (C1) und zweiter Konzentration (C2), oder Bildung eines zweiten Quotienten (Q2) aus dritter (C3) und erster Konzentration (C1), oder Bildung eines dritten Quotienten (Q3) aus dritter (C3) und zweiter Konzentration (C2), wobei eine zur Bildung des ersten (Q1), zweiten (Q2) oder dritten Quotienten (Q3) erforderliche und bei Schritt b) nicht ermittelte Konzentration (C1, C2, C3) gemäß folgender Beziehung: C3 - C2 = C1 errechnet wird; und d) Korrelation des ersten, zweiten oder dritten Quotienten (Q1, Q2, Q3) mit dem Blutgerinnungsstatus.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

107049574 #2

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	03 OCT 2000
WIPO	PCT

DE 00 02748

4

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 37 654.9

Anmeldetag: 14. August 1999

Anmelder/Inhaber: november AG Novus Medicatus Bertling Gesellschaft
für Molekulare Medizin, Erlangen/DE

Bezeichnung: Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerin-
nungsstatus

IPC: G 01 N, C 12 Q

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 20. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
 Im Auftrag

Nietledt



1

Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus.

5

Die Bestimmung des Blutgerinnungsstatus kann indirekt durch Ermittlung der Prothrombinkonzentration in menschlichen Körperflüssigkeiten erfolgen. Bei Prothrombin handelt es sich um ein Protein, welches vorwiegend im Plasma des menschlichen Bluts vorkommt. Prothrombin ist mitverantwortlich für die Blutgerinnung. Es wandelt lösliches Fibrinogen in unlösliches Fibrin um.

10 Die durch Prothrombin induzierte Umwandlung des Fibrinogens erfolgt nur dann, wenn Prothrombin in natürlicher carboxylierter Form vorliegt. Die Carboxylierung erfolgt in der Leber durch eine Carboxylase unter Bindung des Co-Faktors Vitamin K. Die Aktivität der Carboxylase ist von der Konzentration an Vitamin K abhängig. Wenn die Vitamin-K-Bindungsstelle 15 der Carboxylase blockiert wird, ist sie nicht aktiv. Es entsteht dann eine abnormale nicht carboxylierte Form des Prothrombins, welche nicht gerinnungsaktiv ist. Die Wirkung oral verabreichter Anticoagulantien beruht auf der Wirkung der Blockierung der Vitamin K Bindungsstellen der Carboxylase.

25

Beim gesunden Menschen liegt das Prothrombin in natürlicher, d.h. carboxylierter, Form vor. Die Carboxylierung wird durch Vitamin-K als Co-Faktor bewirkt. Bei kranken Menschen, insbesondere bei Menschen mit Leberschäden, oder bei Zugabe von 30 Antikoagulantien, kommt Prothrombin auch in der abnormalen Form vor.

Das carboxylierte Prothrombin bewirkt eine Gerinnung nur dann, wenn zuvor Ca^{2+} -Ionen gebunden werden. Nur dann ist das carboxylierte Prothrombin in der Lage, an die Membranen der Blutplättchen zu binden und eine Gerinnung zu bewirken. Nur die carboxylierte Form des Prothrombins kann Calcium binden.
5 Somit lässt der Gehalt an carboxyliertem Prothrombin auf den Blutgerinnungsstatus schließen.

Aus der US 4,769,320 ist ein Verfahren bekannt, bei dem die
10 Ermittlung des Gehalts an carboxyliertem Prothrombin unter Verwendung spezifischer Antikörper für Prothrombin mittels Immunoassay erfolgt.

Aus der US 5,352,712 ist ein monoklonaler Antikörper bekannt,
15 der spezifisch für nicht-carboxyliertes Prothrombin ist. Unter Verwendung dieses Antikörpers lässt sich mittels Immunoassay die Konzentration an nicht-carboxyliertem Prothrombin ermitteln. Auch damit ist eine Aussage über den Blutgerinnungsstatus möglich.

Nach dem Stand der Technik tritt das Problem auf, daß das zu analysierende Probenmaterial nicht immer unmittelbar nach der Entnahme der Probe analysiert wird. Durch die Versendung des Probenmaterials vergehen mitunter 1 bis 2 Tage. Die meisten
25 der an der Blutgerinnung beteiligten Faktoren sind hoch empfindlich und schnell inaktiv. Es wird während dieser Zeit wird u.a. sowohl carboxyliertes als auch nicht-carboxyliertes Prothrombin in der Probe abgebaut. Einer Verfälschung der Ergebnisse des Blutgerinnungsstatus ist die Folge.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere die Genauig-
30

keit der Ermittlung des Blutgerinnungsstatus mittels der Bestimmung des Prothrombingehalts erhöht werden.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 2
gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung ergeben
sich aus den Merkmalen der Ansprüche 3 bis 15.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten vorgesehen:

- 15 a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält,

20 b1) Ermittlung einer ersten Konzentration an carboxyliertem Prothrombin unter Verwendung eines ersten Antikörpers und Ermittlung einer zweiten Konzentration an decarboxyliertem Prothrombin unter Verwendung eines zweiten Antikörpers,

25 c) Bildung eines ersten Quotienten aus erster und zweiter Konzentration und

25 d) Korrelation des Quotienten mit dem Blutgerinnungsstatus.

Nach einer weiteren Variante ist ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten vorgesehen:

- 30

a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält.

b2) Ermittlung einer Gesamtkonzentration an carboxyliertem und decarboxyliertem Prothrombin unter Verwendung eines dritten Antikörpers und Ermittlung einer zweiten Konzentration an decarboxyliertem Prothrombin unter Verwendung eines zweiten Antikörpers.

5

c1) Errechnung einer ersten Konzentration an carboxyliertem Prothrombin gemäß folgender Beziehung:

10

$$C_3 - C_2 = C_1$$

und Bildung eines ersten Quotienten aus erster und zweiter Konzentration

15

oder

c2) Bildung eines zweiten Quotienten aus dritter und erster Konzentration und

20

d) Korrelation des ersten bzw. zweiten Quotienten mit dem Blutgerinnungsstatus.

Unter einem durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbaren Protein wird ein Protein verstanden, das in Abhängigkeit des Blutgerinnungsstatus anteilig sowohl carboxylierter als auch in decarboxylierter Form vorliegen kann.

Mit den erfundungsgemäßen Verfahren ist es möglich, auf der Basis des Gehalts an modifizierbarem Protein den Blutgerinnungsstatus genau zu ermitteln. Die Betrachtung sowohl des Gehalts an carboxyliertem Protein als auch des Gehalts an de-carboxyliertem Prothrombin und das Inbeziehungsetzen der bei-

den vorgenannten Proteingehalte werden Fehler bei der Bestimmung des Blutgerinnungsstatus minimiert.

- Bei der Körperflüssigkeit kann es sich zweckmäßigerverweise um
- 5 Plasma, Blut, Speichel, Urin oder dgl. handeln. Geeignet sind grundsätzlich alle Körperflüssigkeiten, in das modifizierbare Protein in einem Gehalt enthalten ist, der eine Messung ermöglicht.
- 10 Nach einem Ausgestaltungsmerkmal der Erfindung erfolgt die Bestimmung der ersten, zweiten und/oder dritten Konzentration mittels eines enzym- oder fluoreszenz-immunologischen Verfahrens. Dabei kann als enzym-immunologisches Verfahren ELISA oder Strip-Assay verwendet werden.
- 15 Es ist aber auch möglich, daß die erste, zweite und/oder dritte Konzentration und/oder der erste bzw. zweite Quotient mittels einer Farbreaktion oder Fluoreszenzdetektion ermittelt wird. Damit ist eine besonders schnelle und einfache Ermittlung des Blutgerinnungsstatus möglich.
- 20 Bei dem ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbaren Protein handelt es sich vorzugsweise um Prothrombin, Nephrocalcin oder Osteocalcin. Es ist auch denkbar zur Bestimmung des Blutgerinnungsstatus andere Proteine benutzen, die von einer Vitamin-K abhängigen Carboxylase carboxyliert werden und ebenfalls mittels oral verabreicherbarer Anticoagulantien beeinflußbar sind. Nephrocalcin ist z.B. im Urin nachweisbar. Es muß bei Benutzung dieses Proteins kein Blut entnommen werden. Das bedeutet für Patienten, deren Blutgerinnungsstatus laufend überwacht werden muß, eine erhebliche Erleichterung.

Es ist ferner ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, wobei zur enzym-immunologischen Bestimmung einer ersten Konzentration an carboxyliertem Prothrombin ein erster Antikörper enthalten ist.

5

Zweckmäßigerweise kann zur Bestimmung einer zweiten Konzentration an decarboxyliertem Prothrombin ein zweiter Antikörper enthalten sein.

10 Es kann sich beim ersten und zweiten Antikörper um nach dem Stand der Technik bekannte Antikörper handeln. Solche Antikörper sind z.B. aus der US 5,252,712 und US 4,769,320 bekannt, deren Inhalt hiermit in die Beschreibung einbezogen wird.

15

Der Kit kann zweckmäßigerweise zur Bestimmung einer Gesamtkonzentration an carboxyliertem und decarboxyliertem Prothrombin einen dritten Antikörper enthalten. Auch dabei kann es sich um einen nach dem Stand der Technik bekannten Antikörper handeln.

20 Der erste und der zweite Antikörper können jeweils auf einem separaten Feld eines Teststreifens aufgenommen sein. Das ermöglicht eine besonders einfache Ermittlung des jeweiligen Gehalts z.B. mittels Farbreaktion.

25 Der dritte Antikörper kann auf einem Feld eines weiteren Teststreifens aufgenommen sein.

30 Zur Vervollständigung des Kits kann jeweils ein zum ersten und zweiten Antikörper korrespondierendes Anti-Prothrombin-Enzym-Konjugat oder ein Anti-Prothrombin-Fluoreszenz-Farbstoff-Konjugat enthalten sein. Vorteilhafterweise kann

auch ein zum dritten Antikörper korrespondierendes Anti-Prothrombin-Enzym-Konjugat oder ein Anti-Prothrombin-Farbstoff-Konjugat enthalten sein.

5 Nachfolgend wird das erfindungsgemäße Verfahren anhand der Zeichnung erläutert. Es zeigen

Fig. 1 die Korrelation des Blutgerinnungsstatus mit cPT/dcPT,

10

Fig. 2 die Korrelation des Blutgerinnungsstatus mit cdPT/cPT und

Fig. 3 die Korrelation des Blutgerinnungsstatus mit dcPT.

15

In Fig. 1 ist der Quotient aus der Konzentration von carboxyliertem und decarboxyliertem Prothrombin über dem Blutgerinnungsstatus INR aufgetragen. Die Konzentration ist hier als OD-Wert gemessen. Bei einem ermittelten Quotienten von 0,5 ergibt sich ein Blutgerinnungsstatus INR von 3,8.

20 In Fig. 2 ist der Quotient aus decarboxyliertem mit carboxyliertem Prothrombin über dem Blutgerinnungsstatus aufgetragen. Es ist ersichtlich, daß der Quotienten hier besonders gut mit dem Blutgerinnungsstatus INR korreliert.

25 Fig. 3 zeigt die nach dem Stand der Technik bekannte Korrelation von dcPT mit dem Blutgerinnungsstatus INR. Diese verändert sich mit zunehmendem Alter der Proben.

30

Beispiel:

Für Serienmessungen besonders geeignet ist der sogenannten Sandwich-ELISA.

a) Probenvorbereitung:

Zu deren Durchführung werden die Kavitäten von Mikrotiterplatten (z.B. Maxisorb, NUNC) über Nacht bei 4°C mit je 50µl

- 5 Capture-Antikörper (10µg/ml in Carbonatpuffer) beschichtet.
 Die Platten werden 3mal mit PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen werden die Platten 1h bei Zimmertemperatur mit 50µl 1% BSA in PBS pro Kavität geblockt.
 Die Platten werden dann 3mal mit PBS/0,05%Tween 20 gewaschen.

10

Anschließend werden die Antigene wie folgt aufgetragen (50µl/Kavität):

Kalibrierplasmen, 1:50 verdünnt in PBS/0,1% BSA

15 Normalplasma, 1:50 verdünnt in PBS/0,1% BSA

Patientenplasma, 1:50 verdünnt in PBS/0,1% BSA

Prothrombindefizientes Plasma (negative Kontrolle)

- 20 Die Platten werden 1h bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend 3mal mit PBS/0,05%Tween 20 gewaschen. Es werden 50µl/Kavität Kaninchen anti Gesamt-Prothrombin (10µg/ml) zugefügt. Dann werden die Platten 1h bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend 3mal mit PBS/0,05%Tween 20 gewaschen. Es werden 50µl/Kavität Ziege anti Kaninchen Antikörper, Biotin-konjugiert, (Dianova, 1:20000 in PBS/0,1% BSA) zugefügt. Die Platten werden 1h bei Zimmertemperatur inkubiert und dann 3mal mit PBS/0,05%Tween 20 gewaschen.

- 30 Es werden 50µl/Kavität Streptavidin-Peroxydase-Konjugat (Roche Diagnostics, 1:1000 in Konjugatpuffer) zugefügt. Die Platten werden 1h bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend 3mal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen.

Dann werden 50 μ l/Kavität ABTS-Lösung (Roche Diagnostics, 1mg/ml) zufügt, und die Platten werden $\frac{1}{2}$ h - 1h bei Zimmertemperatur inkubiert. Schließlich werden die Platten im ELISA-Reader gemessen.

5

b) Auswertung:

Es werden

- aa) die Absorptionswerte (OD) des Gesamtprothrombins (Kavitäten mit anti Gesamt-Prothrombin mAK beschichtet),
 - 10 bb) der OD von Descarboxy-Prothrombin (Kavitäten mit anti-Descarboxy-Prothrombin mAK) und
 - cc) der OD von carboxylierten Prothrombin (OD Gesamt-PT - OD Descarboxy-PT)
- bestimmt.

15

Dann werden Eichkurven aus den gemessenen OD-Werten (siehe Fig. 1 - 3: Punkte A,B,C und D) der Kalibrierplasmen erstellt und der INR der Patientenplasmen berechnet.

2010A.BC:

#0515 P.011

DR.-ING.W.GASSNER

16.AUG.1999 15:15 +49 9131 160966

10

Patentansprüche

1. Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten:

5

a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält,

10

b1) Ermittlung einer ersten Konzentration (C1) an carboxyliertem Prothrombin unter Verwendung eines ersten Antikörpers (A1) und Ermittlung einer zweiten Konzentration (C2) an decarboxyliertem Prothrombin unter Verwendung eines zweiten Antikörpers (A2),

15

c) Bildung eines ersten Quotienten (Q1) aus erster (C1) und zweiter Konzentration (C2) und

20

d) Korrelation des Quotienten (Q) mit dem Blutgerinnungsstatus.

2. Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten:

25

a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält,

30

b2) Ermittlung einer Gesamtkonzentration (C3) an carboxyliertem und decarboxyliertem Prothrombin unter Verwendung eines dritten Antikörpers (A3) und Ermittlung einer zweiten Konzentration (C2) an decarboxyliertem Prothrombin unter Verwendung eines zweiten Antikörpers (A2),

11

c1) Errechnung einer ersten Konzentration (C1) an carboxyliertem Prothrombin gemäß folgender Beziehung:

$$C_3 - C_2 = C_1$$

5

und Bildung eines ersten Quotienten (Q1) aus erster (C1) und zweiter Konzentration (C2)

oder

10

c2) Bildung eines zweiten Quotienten (Q2) aus dritter (C3) und erster Konzentration (C1) und

15

d) Korrelation des ersten bzw. zweiten Quotienten (Q1, Q2) mit dem Blutgerinnungsstatus.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Körperflüssigkeit Plasma, Blut, Speichel, Urin oder dgl. ist.

20

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bestimmung der ersten (C1), zweiten (C2) und/oder dritten Konzentration (C3) mittels eines enzym- oder fluoreszenz-immunologischen Verfahrens erfolgt.

25

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als enzym-immunologisches Verfahren ELISA oder Strip-Assay verwendet wird.

30

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste (C1), zweite (C2) und/oder dritte Konzentration (C3) und/oder der erste bzw. zweite Quotient (Q1, Q2) mittels einer Farbreaktion oder Fluoreszenzdetektion ermittelt wird.

35

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifiziert.

bare Protein Prothrombin, Nephrocalcin oder Osteocalcin ist.

8. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur enzym-immunologischen Bestimmung einer ersten Konzentration (C1) der carboxylierten Form des Proteins ein erster Antikörper (A1) enthalten ist.
- 10 9. Kit nach Anspruch 7, wobei zur Bestimmung einer zweiten Konzentration (C2) der decarboxylierten Form des Proteins ein zweiter Antikörper (A2) enthalten ist.
- 15 10. Kit nach einem der Ansprüche 7 oder 8, wobei zur Bestimmung einer Gesamtkonzentration (C3) an carboxyliertem und decarboxyliertem Protein ein dritter Antikörper (A3) enthalten ist.
- 20 11. Kit nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei der erste (11) und der zweite Antikörper (12) jeweils auf einem separaten Feld eines Teststreifen aufgenommen sind.
- 25 12. Kit nach einem der Ansprüche 7 bis 10, wobei der dritte Antikörper (A3) auf einem Feld eines weiteren Teststreifens aufgenommen ist.
- 30 13. Kit nach einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei jeweils ein zum ersten (A1) und zweiten Antikörper (A2) korrespondierendes Anti-Protein-Enzym-Konjugat oder ein Anti-Protein-Fluoreszenz-Farbstoff-Konjugat enthalten ist.
- 35 14. Kit nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei ein zum dritten Antikörper (A3) korrespondierendes Anti-Protein-Enzym-Konjugat oder ein Anti-Protein-Fluoreszenz-Farbstoff-Konjugat enthalten ist.

13

15. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 14, wobei das Protein Prothrombin, Nephrocalcin oder Osteocalcin ist.

5

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur indirekten Bestim-
mung des physiologischen Blutparameters mit folgenden Schrit-

5 ten:

- a) Entnahme von Prothrombin enthaltender Körperflüssigkeit,
- 10 b1) Ermittlung einer ersten Konzentration an carboxyliertem Protein unter Verwendung eines ersten Antikörpers und Ermittlung einer zweiten Konzentration an decarboxyliertem Protein unter Verwendung eines zweiten Antikörpers,
- c) Bildung eines ersten Quotienten aus erster und zweiter Konzentration und
- 15 d) Korrelation des Quotienten mit dem physiologischen Blutparameter.

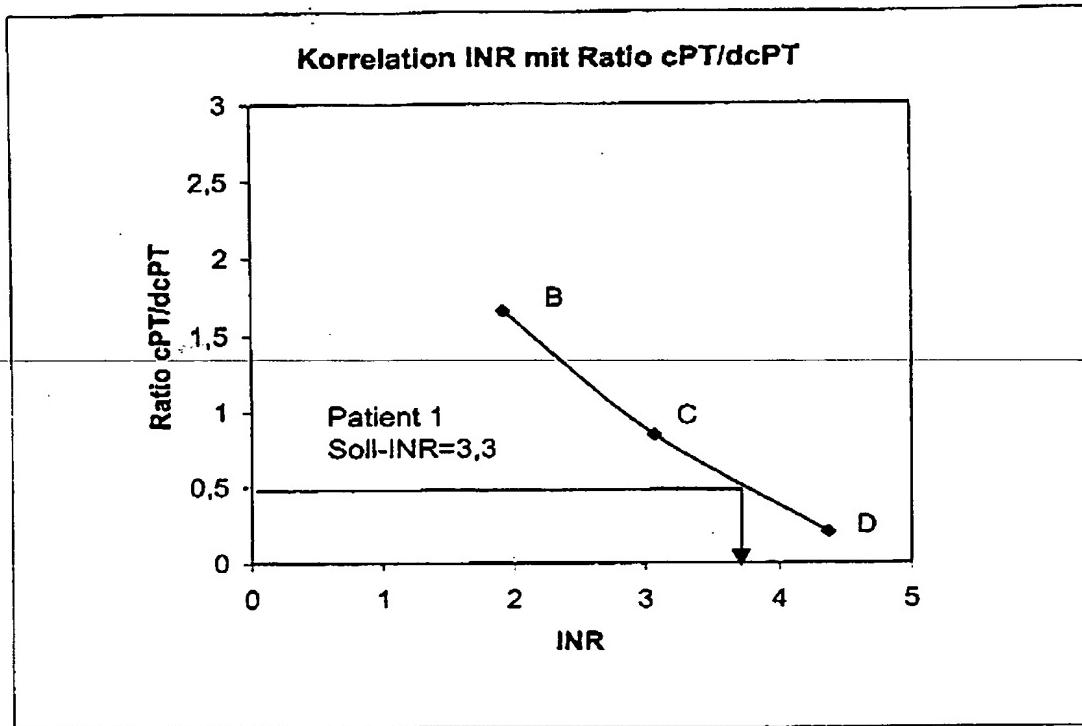


Fig. 1

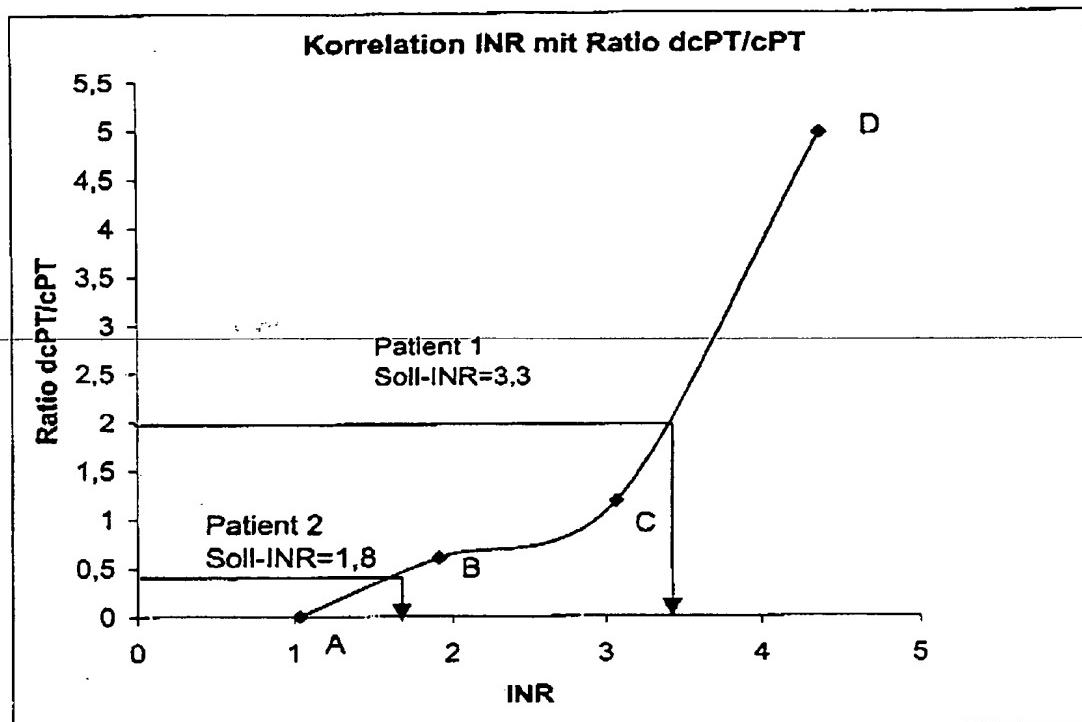


Fig. 2

19

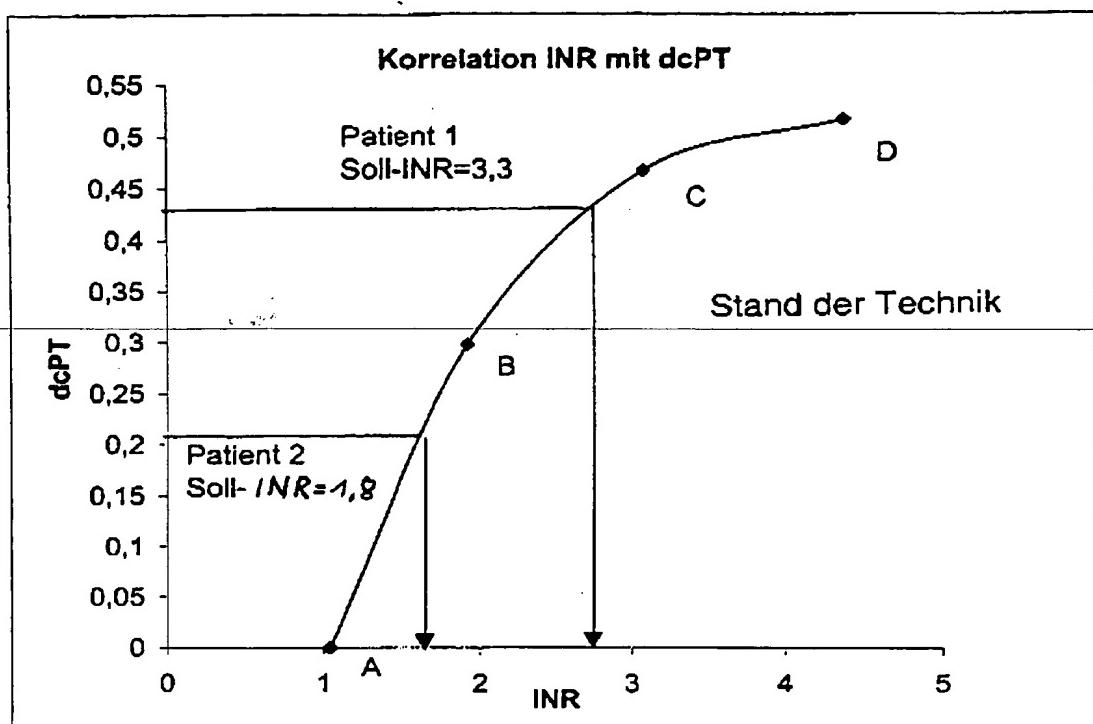


Fig. 3